

Raportare stiintifica

privind rezultatele obtinute in cadrul proiectului

Bandaj resorbabil cu eliberare controlata de norfloxacin pentru vindecarea arsurilor NR. 538PED/2020

Etapa 2 - Inarcarea fibrelor de chitosan nanoporoase cu norfloxacin

Rezumatul etapei

In aceasta etapa a proiectului s-a propus obtinerea de fibre nanoporoase de chitosan incarcate cu norfloxacin si sigilate prin iminare cu aldehida boronica, precum si investigarea acestora in vederea aplicarii ca bandaje pentru vindecarea arsurilor.

Raport stiintifico-tehnic

Act 2.1 - Obtinere de fibre de chitosan nanoporoase

Aplicand conditiile de electrofilare stabilite in etapa 1 a proiectului au fost obtinute fibre de chitosan microporoase care au fost utilizate in investigatiile ulterioare. Fibrele au fost caracterizate morfologic si au condus la date similare celor raportate in etapa I, confirmand reproductibilitatea metodei.

Act 2.2 - Inarcarea fibrelor cu norfloxacin

Inarcarea fibrelor nanoporoase de chitosan cu norfloxacin, a fost realizata prin imersarea fibrelor in solutii de norfloxacin (NFX) in apa sau etanol. Prezenta medicamentului in fibre a fost evidentiata prin spectroscopie FTIR iar monitorizarea gradului de incarcare a fost realizata prin trei metode complementare: cantarire, ¹H-RMN, UV-vis. S-a observat o buna concordanta a datelor obtinute prin metodele spectroscopice.

Act 2.3 - Sigilarea fibrelor

Sigilarea fibrelor incarcate cu NFX a fost realizata prin spray-ere cu o solutie de aldehida boronica de concentratie cunoscuta, ales astfel incat sa nu se depaseasca un grad de iminare de 10%. Monitorizarea calitatii sigilarii fibrelor a fost realizat prin microscopie SEM, AFM, POM si spectroscopie FTIR, care au demonstrat atat faptul ca aldehida boronica s-a legat covalent de fibre prin iminare cat si distributia uniforma pe suprafata fibrelor.

Act 2.4 - Determinarea biocompatibilitatii in vitro a bandajelor obtinute

Testarea biocompatibilitatii *in vitro* a fost realizata pe celule NHDF, in conformitate cu protocolul standard pentru bandaje descris in proiect. S-a observat ca nanofibrele prezenta norfloxacinului imbunatatesc biocompatibilitatea fibrelor de chitosan.

Act 2.5 - Determinarea biodegradabilitatii enzimatice a bandajelor obtinute

Testarea biodegradabilitatii esantionelor bandajelor a fost monitorizata in prezenta lizozimei, la 3 valori diferite de pH, specifice exudatului arsurilor pentru cele 3 etape ale vindecarii (pH=8.5, 9, 10), si doua concentratii diferite ale lizozimei specifice exudatului tesutului infectat si neinfestat. Rezultatele au arata ca incarcarea fibrelor cu NFX conduce la o usoara incetinire a vitezei de biodegradare a fibrelor la pH 8.5 si 10, posibil datorita formarii de legaturi de hidrogen cu matricea de fibre, care ecraneaza accesul lizozimei catre lanturile de chitosan. Cresterea concentratiei de lizozima nu a produs o accelerare a biodegradarii.

Imaginile SEM ale fibrelor degradate prezinta o suprafata mai rugoasa in comparatie cu cele initiale, indicand o degradare progresiva de la suprafata spre interior, sustinuta si de imaginile POM care au aratat diferente ale nuanțelor de culoare asociate cu grosimi diferite a fibrelor provocate de erodarea acestora.

Act 2.6 - Teste de eliberare in vitro de norfloxacin

Testarea eliberării *in vitro* a NFX din bandaje a fost realizată în condiții care mimează mediul unei arsuri pe parcursul vindecării: PBS de pH=9, cu conținut de lizozima (mediul caracteristic etapei II - critică pentru vindecare). S-a observat că sigilarea cu aldehida boronică încetinește eliberarea NFX, asigurând o eliberare progresivă a acestuia.

Act 2.7 - Determinarea activității antimicrobiene a bandajelor

Activitatea antimicrobială a bandajelor a fost investigată pe patogeni specifici arsurilor: bacterii gram-pozitive (*S. aureus*, *E. faecalis*), bacterii gram-negative (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) și fungi (*Candida sp.*, *Aspergillus sp.*) urmând protocolul specific pentru bandaje menționat în proiect. S-a constatat că fibrele de chitosan încărcate cu norfloxacin și sigilate cu aldehida boronică au activitatea antimicrobiană cea mai intensă și cu spectrul cel mai larg, rezultat din cumularea activității celor trei componente (chitosan, NFX, aldehida boronică).

Act 2.8 - Testarea biocompatibilității in vivo a bandajelor

Testarea biocompatibilității *in vivo* a fost realizată în conformitate cu protocolul propus în proiect, prin stabilirea impactului bandajelor implantate subcutanat în soareci, asupra parametrilor sângelui, activității enzimatică în ficat și markerilor sistemului imunitar. Au fost investigate esanțioanele de fibre încărcate cu NFX și sigilate cu aldehida boronică și esanționale de fibre de chitosan și fibre de chitosan sigilate cu aldehida boronică drept referințe, pentru a permite aprecierea influenței fiecărui component a bandajului. O netesută de bumbac a fost utilizată drept referință pozitivă și apa distilată drept referință negativă. Analiza parametrilor sângelui, a parametrilor funcționării normale a ficatului și rinichilor, precum și cei specifici sistemului imunitar, la 24 h și 7 zile, au confirmat faptul că bandajele sunt biocompatibile și pot fi utilizate pentru scopul propus. Examenul microscopic a zonei unde s-a făcut implantarea nu a arătat modificări morfologice notabile, arătând că fibrele studiate pot fi utilizate în condiții de siguranță. Mai mult, examenul histopatologic al probelor recoltate din organe sensibile la influența unor stimuli externi toxici (ficat, rinichi), nu a relevat modificări ale acestora, indicând odată în plus posibilitatea utilizării *in vivo* în siguranță.

Act 2.9 - Crearea modelului de arsura la soareci

Modelul de arsura pe soareci a fost realizat prin contactul direct cu o tija fierbinte a unei părți bine determinată a corpului soarecelui, urmând un protocol standardizat, în acord cu protocoalele etice ale Universității Gr. Popa, care a constatat în producerea unei arsuri în zona dorsală a soarecelui cu o tija încălzită în apă fierbinte. A fost produsă astfel

Act 2.10 - Determinarea eficienței bandajelor în vindecarea arsurilor acute

Eficiența bandajelor în vindecarea arsurilor acute a fost evaluată pe modelul de arsura creat la activitatea 2.9, prin urmărirea evoluției vindecării timp de 7 zile după aplicarea bandajului. Animalele experimentale au fost împărțite în loturi de câte 6 soareci, incluzând un model negativ (arsura pe care nu s-a aplicat nimic) și un model pozitiv (arsura pe care s-a aplicat un bandaj comercial). În cursul experimentului au fost monitorizate: greutatea șobolanului, aportul de apă și de alimente, precum și starea sa generală, pentru a nota tulburările de comportament. S-au urmărit zilnic semnele de disconfort/durere, modificările de comportament, scârpinare/mușcare a unei zone până la apariția excoriațiilor, expresia facială asociată cu durerea, variații ale obiceiurilor alimentare sau hidrice. Imediat după producerea arsurii și în zilele 1, 3 și 7, mărimea plăgii a fost măsurată cu rigla și s-au observat următoarele aspecte morfologice locale: aspect general, culoare, consistență, margini, timpul de formare a crustei și detașarea acesteia, înroșirea, umflarea, secreția, sângerarea, scorjirea, crusta, granulația și țesutul cicatricial sau infecțiile. În urma fiecărei evaluări, rănilor s-au fotografiat, pentru utilizare suplimentară în scopul estimării comparative. Monitorizarea vizuală a evoluției dimensiunii zonei arse s-a realizat prin preluarea de imagini cu o cameră digitală, în aceleași condiții de iluminare și setări, de la o distanță standard de 35 cm, în zilele 1, 3, 7 după

producerea arsurii. O riglă a fost plasată pe partea laterală a răni pentru a acționa ca o scară cunoscută între pixeli, care au fost utile pentru calcularea zonei răni de către software-ul Image J versiunea 1.8.0. Rezultatele au aratat o imbunatatire clara a acestor parametri pentru fibrele sigilate cu aldehida boronica.

Pentru evaluarea influenței produse de aplicarea nanofibrelor la animalele cu arsură provocată experimental asupra profilului hematologic, imunitar și a influenței asupra stresului oxidativ s-a recoltat sânge din vena laterală a cozii. S-au efectuat următoarele determinări: formula leucocitară, parametrii imunitari: activitatea complementului seric (C), nivelul seric al fracțiunilor C3 și C4 ale complementului, capacitatea de fagocitoză a polimorfonuclearelor neutrofile din sângele periferic (testul NBT), IL-1, IL-6, TNF alfa, nivelul cortizolului în sânge, activitatea unor enzime implicate în stresul oxidativ: malondialdehida, glutatation peroxidaza, superoxid dismutaza. Analizele de laborator s-au realizat cu ajutorul unor Analizoare speciale, pentru fiecare determinare în parte. Rezultatele obținute au fost exprimate sub forma mediei aritmetice \pm deviația standard (D.S.) a mediei valorilor pentru fiecare parametru determinat și pentru fiecare substanță studiată în parte și au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului SPSS, varianta 17.0 pentru Windows și metoda ANOVA unifactorială. Acestea au permis aprecierea semnificației diferențelor consemnate în cadrul aceluiași lot de animale, diferențele constatate între loturile testate, raportate la lotul martor. Valorile coeficientului p (probabilitatea) mai mici decât 0,05 au fost considerate semnificative statistic. Si in acest caz, examenele de laborator au indicat o imbunatatire a performantelor fibrelor sigilate cu aldehida boronica.

În vederea realizării examenului histopatologic, câte doi șobolani din fiecare grup au fost sacrificați după 1, 3, și respectiv 7 zile de la inducerea arsurii, pentru analiza morfologiei microscopice a plăgii. După sacrificarea animalelor s-a excizat zona de arsură cu pielea sănătoasă din jur, s-a prelucrat corespunzător și a fost analizată cu o cameră histologică digitală. Au fost examinate microscopic toate straturile pielii, cu observarea integrității epidermului, dermului și a grăsimii subcutanate și s-a notat profunzimea răni arse, în funcție de stratul granular al epidermei. S-au analizat modificările locale la nivelul leziunii de arsură (prezența reacției inflamatorii, leziunile vasculare, necroza, țesutul de granulație, țesutul conjunctiv și re-epitelializarea). Din datele obținute s-a putut observa ca sigilarea fibrelor cu aldehida boronica a condus la imbunatatirea evidenta a reactiilor adverse produse de arsura inca din primele 3 zile, atat fata de modelul negativ cat si fata de modelul pozitiv. Mai mult, fibrele incarcate cu norfloxacin si sigilate cu aldehida boronica au condus la disparitia aproape totala a acestor efecte dupa 7 zile de la provocarea arsurii.

Act 2.11 - Crearea modelului de arsura infectata la soareci

Pentru evaluarea eficienței formularilor în vindecarea arsurilor infectate a fost realizat un model de arsura infectată prin inocularea de colonii de *Staphylococcus aureus* în arsurile termice produse la modele animale. Pentru aceasta după realizarea arsurii termice similar cu activitatea A.2.9, au fost inoculate în țesutul extern al arsurii colonii de *S. Aureus*, și păstrate pentru incubare timp de 24 ore, când s-a observat o inflamare specifică țesuturilor infectate.

Act 2.12 - Eficienta bandajelor in vindecarea arsurilor infectate

Pentru această investigație s-a aplicat protocolul de lucru descris la activitatea 2.11, și au fost monitorizați markerii inflamatorii și imunitari (formula leucocitară, viteza de sedimentare a hematiilor, fibrinogenul, proteina C reactivă, nivelul interleukinelor 1 și 6, activitatea complementului seric și capacitatea de fagocitoză a polimorfonuclearelor neutrofile în sângele periferic), la 24 de ore și 7 zile după aplicarea formularilor pe arsurile infectate. În timp ce loturile tratate cu fibre simple și fibre neincarcate cu norfloxacin au aratat o modificare clara a acestor parametri specifici producerii infectiei, fibrele incarcate cu norfloxacin au indicat valori apropiate de cele ale martorului pozitiv, indicand faptul ca prezenta norfloxacinului anihileaza infectia cu *S. Aureus*.

Act 2.13 - Analiza datelor obtinute de cei doi parteneri

Datele privitoare la bandajele obtinute (analiza morfologica, MES, conversia de iminare (sigilare), biocompatibilitatea in vitro, biodegradabilitatea in vitro, viteza de eliberare, activitatea antimicrobiana) au fost analizate comparativ pentru a stabili formularile cele mai eficiente si pentru a propune modalitati de optimizare a eficientei. S-a observat ca sigilarea fibrelor prin iminare ofera avantajul unui efect de eliberare prelungita a medicamentului si un efect antimicrobian atat fata de bacterii cat si fata de fungi.

Totodata, sigilarea fibrelor prin iminare a crescut eficienta in vindecarea arsurilor la sobolani. Pe de alta parte s-a observat ca incarcarea unei cantitati mai mari de norfloxacin a fost benefica vindecarii mai rapide a ranilor.

Act 2.14 - Optimizarea compozitiei bandajelor

Analiza acestor date, a condus la concluzia ca optimizarea bandajelor trebuie sa implice varierea cantitatii de norfloxacin la valori intermediare celor studiate.

Act 2.15 - Diseminarea pe scară largă prin comunicarea și publicarea națională sau internațională a rezultatelor

Datele privitoare la otimizarea caili de iminare fibrelor in vederea sigilarii au fost redactate sub forma unei lucrari stiintifice care a fost publicata in jurnalul Cellulose Chemistry and Technology:

Datele privitoare la iminarea fibrelor cu aldehida boronica si proprietatile acestora care afecteaza aplicarea ca bandaje pentru vindecarea ranilor au fost redactate sub forma unui manuscris trimis spre publicare in revista Pharmaceutics.

Datele privitoare la biocompatibilitatea si eficienta vindecarii arsurilor a fibrelor incarcate cu norfloxacin si sigilate prin iminare au fost redactate sub forma prezentului raport stiintific si constituie baza redactarii unui manuscris stiintific care va fi trimis spre publicare anul viitor.

Pagina WEB a proiectului a fost actualizata cu noile date obtinute in etapa II a proiectului.

Act 2.16 - Diseminarea rezultatelor prin participare la manifestări tehnico-științifice

Datele privitoare la iminarea fibrelor cu aldehida boronica si proprietatile acestora care afecteaza aplicarea ca bandaje pentru vindecarea ranilor au constituit subiectul unei prezentari orale si a unui poster prezentate la 2 manifestari stiintifice, una internationala si una nationala.

Deasemeni, datele privitoare la sigilarea fibrelor de chitosan prin iminare prezentate sub forma de poster la Progress in organic and macromolecular compounds, MacroIasi, au fost publicate sub forma unui proceeding in volumul manifestarii.

Concluzii:

Toate activitatile prevazute in etape II de realizare a proiectului au fost indeplinite cu succes, si indicatorii propusi (1 lucrare stiintifica trimisa spre publicare, 2 prezentari la manifestari stiintifice nationale/internationale) au fost realizati.

**Director Proiect,
Dr. Habil. Luminita Marin**

